

**抗がん剤の副作用に対する生薬抽出物および
漢方薬の有効性に関する基礎的検討**

2 0 1 6 年

小中 健

本文中で用いた省略形

[Ca²⁺]_i: 細胞内カルシウム濃度
Ψ_m: ミトコンドリア膜電位
A549 細胞: 肺癌由来細胞株細胞
AChE: アセチルコリンエステラーゼ
AMPK: AMP 活性化プロテインキナーゼ
ATP: アデノシン三リン酸
BK: ブラジキニン
BSA: ウシ血清由来アルブミン
Ca²⁺: カルシウムイオン
CCCP: カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン
CIPN: chemotherapy induced peripheral neuropathy (末梢神経障害)
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO: dimethyl sulfoxide
EGTA: glycoletherdiamine-tetraacetate
eNOS: 一酸化窒素合成酵素
FBS: ウシ胎仔血清
GAP-43: growth associated protein-43
HS: ウマ血清
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)
L-OHP: Oxaliplatin (オキサリプラチン)
LY294002: 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1-(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride
MTT: 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
NF-L: neurofilament light
NGF: nerve growth factor (神経栄養因子)
NO: 一酸化窒素
P-Akt: phospho-Akt
PBS: phosphate buffered saline
PBS-T: 0.05% Tween20 含有 PBS
PC/SM: Penicillin/streptomycin
PC12 細胞: ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫
P-eNOS: phospho-eNOS
P-Erk: phospho-Erk
PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride
PTX: パクリタキセル

S. E. : 標準誤差

TBS: tris-HCl buffer solution

TBS-T: 0.05% Tween20 含有 TBS

U0126: 1, 4-diamino-2, 3-dicyano-1, 4-bis[2-amino-phenylthio]butadiene

VNR: ビノレルビン

目次

緒論.....	6
第 1 章 血管内皮細胞における VNR 誘発性血管傷害に対する生薬抽出物の保護効果	9
第 1 節 実験材料および実験方法.....	11
1-1 試薬	11
1-2 葛根湯構成生薬の抽出方法	11
1-3 細胞培養	12
1-4 ATP assay による細胞傷害の評価	12
1-5 JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位測定	13
1-6 Fluo-4 AM を用いた細胞内カルシウム測定.....	13
1-7 ウエスタンブロットによる Akt および eNOS のリン酸化比較.....	14
1-8 統計処理	15
第 2 節 結果.....	16
1-9 葛根湯構成生薬の VNR 誘発性細胞傷害に対する影響.....	16
1-10 葛根湯構成生薬によるミトコンドリア膜電位への影響	17
1-11 マオウ抽出物による $[Ca^{2+}]_i$ および細胞への影響	19
1-12 VNR による eNOS のリン酸化阻害に対するマオウ抽出物の影響	21
第 3 節 考察.....	23
第 2 章 神経様細胞における PTX 誘発性末梢神経障害に対する漢方薬の修復促進効果 に関する検討.....	26
第 1 節 実験材料および実験方法.....	28
2-1 試薬	28
2-2 細胞培養	28
2-3 漢方製剤サンプルの作製	29

2-4	MTT assay による細胞傷害の評価	29
2-5	神経突起伸展の評価	30
2-6	タンパク質の抽出	30
2-7	ウエスタンブロットを用いた Akt および Erk のリン酸化の比較	30
2-8	AChE の測定.....	31
2-9	統計処理	32
第 2 節	結果.....	33
2-10	PTX 誘発性神経障害モデル細胞の作製	33
2-11	PTX 誘発性神経障害に対する漢方薬の影響	34
2-12	神経突起伸長促進作用に関するシグナル経路における漢方薬の影響	36
2-13	漢方薬の Akt および Erk に対する影響.....	38
2-14	ヒト肺がん細胞における PTX の抗腫瘍効果に対する漢方薬の影響.....	39
第 3 節	考察.....	40
総括	43
参考文献	45
謝辞	48

緒論

厚生労働省の発表によると、がんは本邦において昭和 56 年より日本人の死因の第 1 位であり、2015 年現在では年間 30 万人以上の国民ががんで亡くなった (Figure 0-1)。また、生涯のうちにがんにかかる可能性は、男性の 2 人に 1 人、女性の 3 人に 1 人と推測される。

そのため、がん治療領域では毎年、多くの抗がん剤が開発されており、多くの医療施設でがん化学療法の件数は増加傾向にある。これは抗がん剤を使用する患者も増加していることを表す。抗がん剤はがん細胞の増殖メカニズムを抑制することでがん細胞を死滅させることを目的とした薬剤であり、増殖が盛んな細胞に作用するという特徴を有する。そのため、増殖能の高いがん細胞は抗がん剤の感受性が高いという性質はあるが、抗がん剤は正常な細胞にも影響を与えてしまう。抗がん剤の種類によって、がんに作用するメカニズムが異なるため、発現しやすい副作用も異なる。代表的な副作用は、末梢神経障害 (CIPN)，

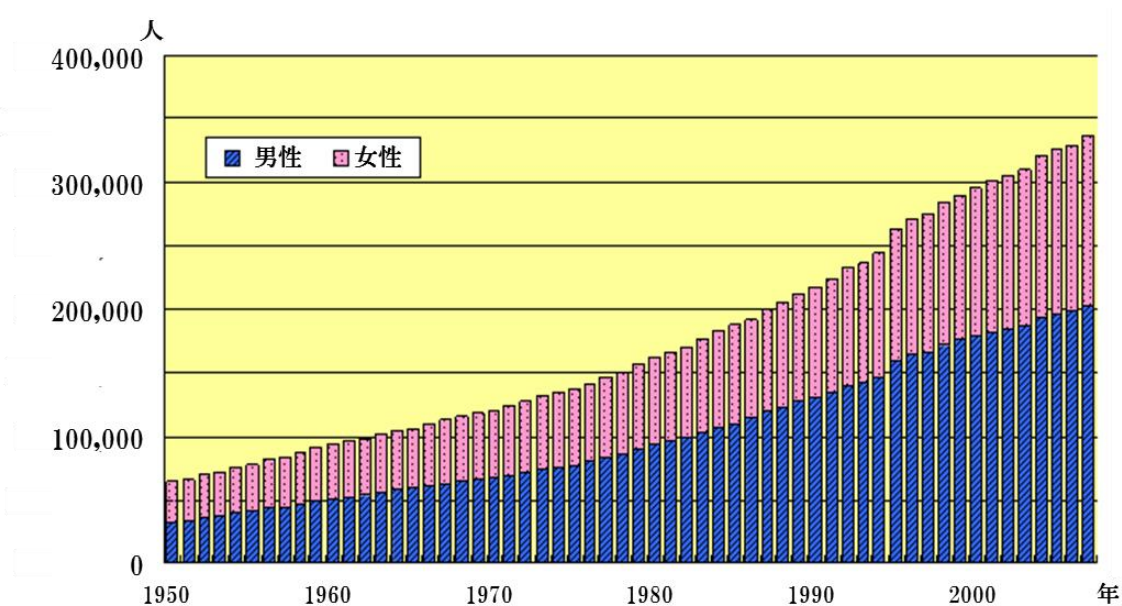


Figure 0-1 がんによる死亡数の推移 (厚生労働省人口動態統計より抜粋)

血管痛、下痢、皮膚障害などがある。これらの副作用は重篤な場合や回復が遷延する場合
には治療の中断や延期をしなければならないため、副作用を予防・軽減するための適切な対策
が必要になるが、有効な対策が確立されていないのが現状である。抗がん剤治療において
最大の治療効果を得るためには投与スケジュール通りに治療を継続することが重要であり、
先述したような副作用への有効な治療法・治療薬の開発が必要になる。特にその中でも投
与毎に経験する可能性の高い血管痛や投与継続するなかで高確率に発現する CIPN などは
有効な対策の確立が急務である。

VNR はキョウチクトウ科ニチニチソウ属のニチニチソウから単離されたビンカアルカロ
イド系化合物を基に開発された抗がん剤であり、有糸分裂微小管の構成タンパク質である
チューブリンに選択的に作用し、その重合を阻害することにより抗腫瘍効果を示す。PTX
はイチイ科イチイ属のセイヨウイチイの樹皮から単離された化合物を基に開発された抗が
ん剤であり、微小管を安定させ、その結果として細胞分裂の間の微小管の正常な分裂を妨
げる。両剤とも多くのがん種に用いられ、化学療法治療において重要な薬剤であるが、同
時に VNR は 5～20%の患者において血管痛を発現し、PTX は 43.8%に CIPN を発現すると
いう副作用を持ち合わせる。VNR の副作用である血管痛に対し溶解する輸液量を少量にし
たり、投与終了後に生理食塩水で後押ししたり、VNR と注射部位との接触時間をできるだ
け短縮する対策が行われるがその効果は不十分である。PTX の副作用である CIPN を改善さ
せるためにビタミン B₁₂ の内服などが行われるが、その効果も決して十分なものではない。

一方、感冒などによく処方される漢方薬の1つである葛根湯はサイトカインの遊離抑制を介した抗炎症作用や抗酸化作用を示唆する報告がある[1, 2]。その他にも、冷え症や下肢痛に処方される牛車腎気丸は第三世代白金系抗がん剤のL-OHPの副作用である痺れに対し有効であったとする報告や抑肝散がPC12細胞において神経突起を促進したという報告などがある[3, 4]。これらの結果は、抗がん剤の副作用対策に漢方薬が有用である可能性を示唆しているが、副作用治療に対する漢方薬の作用機序はほとんど解明されておらず、またエビデンスにも乏しいことから積極的な利用がなされていないのが現状である。そこで本研究では、抗がん剤の副作用治療に対する漢方薬のエビデンスを構築することを目的に、実臨床で抗がん剤の副作用治療薬としてエビデンスがあるが、その明確な作用機序が明らかになっていない漢方薬に着目し、抗がん剤の副作用治療における生薬成分や漢方薬の詳細な作用メカニズムの解明を試みた。

本研究は生薬の新しい作用機序解明や新たなエビデンスの蓄積に貢献する可能性を持ち、基礎研究と臨床医学の両方の観点から極めて重要である。

第1章 血管内皮細胞における VNR 誘発性血管傷害に対する生薬抽出物の保護効果

進行するがんに対しがん化学療法を安全に継続して行うことはとても重要である[5]。しかし、VNR やアムルピシンなど一部の抗がん剤は高頻度に投与時の血管痛や血管炎などの血管障害を伴い、治療継続の妨げとなっているとの報告がある[6]。投与時の血管痛は患者にとって毎回の不安や苦痛を伴うため、予防策や改善策が待ち望まれるが、現在、有用な対策は未だ確立されていない。植物由来のビンカアルカロイド系抗悪性腫瘍剤である VNR による血管障害の機序は、酸化ストレスを制御している eNOS の減少による Ψ_m の脱分極を介して、血管障害を起こすという報告がある[7, 8]。一方、感冒や炎症性疾患に利用される漢方薬の1つである葛根湯には、プロスタグランジン E_2 やインターロイキン- 1α の遊離抑制を介した抗炎症作用や抗酸化作用による細胞障害に対する保護作用を示唆する報告がある[1, 2]。このことから、葛根湯がもつ抗炎症作用や抗酸化作用により、VNR による血管障害が抑制される可能性が示唆されるが、このことについてはほとんど検討されていない。

そこで、著者は葛根湯の持つ細胞保護作用に着目し、葛根湯が VNR により誘発される血管障害に対して保護作用を示すかどうかについて検討を進めることとした。VNR による血管障害は VNR を静脈注射する際の VNR と血管の接触が血管内皮の障害につながり、血管痛などの症状につながることから本実験では正常な血管内皮細胞であり、多くの血管障害の検討実験に用いられる HUVEC を用いた。さらに、葛根湯による様々な作用は報告されていたが、葛根湯を構成するどの生薬が活性中心の生薬かについての検討がなかったことか

ら、著者はどの生薬が細胞保護作用に大きく寄与しているかを明らかにするため、葛根湯を構成する7つの生薬を用いて、細胞障害や $[Ca^{2+}]_i$ の変化、eNOS におけるリン酸化の変化などの評価を行った。

第1節 実験材料および実験方法

1-1 試薬

HUVEC, 内皮細胞増殖培地 (5% BSA, 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ヒドロコルチゾン, 0.5 ng/mL 血管内皮増殖因子, 5 ng/mL 上皮成長因子, 10 ng/mL ヒト線維芽細胞増殖因子, 20 ng/mL インスリン様成長因子, 1 μg アスコルビン酸), 内皮細胞基本培地はロンザ・ジャパン株式会社から購入した。VNR, BK, インスリン, ニフェジピンは和光純薬工業株式会社より購入した。EGTA は同仁堂株式会社, eNOS 抗体, P-eNOS (Ser¹¹⁷⁷) 抗体, Akt 抗体, P-Akt 抗体は CST ジャパン株式会社, CCCP はシグマアルドリッチジャパンより購入した。BSA はナカライテスク株式会社, ECL ウェスタンブロッティング検出試薬は GE ヘルスケア・ジャパン株式会社より購入した。

1-2 葛根湯構成生薬の抽出方法

葛根湯構成生薬 (日局カッコン, 日局タイソウ, 日局マオウ, 日局カンゾウ, 日局ケイヒ, 日局シャクヤク, 日局ショウキョウ) はいずれも刻み生薬で, 株式会社ツムラより購入した。各生薬成分の抽出方法は, まず, 刻み生薬 5 g を 100 mL の水に入れ 1 時間煎じた。その後, フィルターを用いて生薬を取り除き, さらに水分がなくなるまで加熱し, 残渣を回収した。全ての実験において内皮細胞基本培地を用いてこの残渣を 1.25 mg (生薬量) /mL になるように希釈調製して用いた。

1-3 細胞培養

HUVEC の培養条件はロンザ・ジャパン株式会社の推奨する条件に基づき、内皮細胞増殖培地にて 37℃, 5% 二酸化炭素, 90% 湿度とした。全ての実験は 1.0×10^4 cells/cm² にて播種し, 2 日間培養した HUVEC を用いて行った。

1-4 ATP assay による細胞傷害の評価

ATP は, 細胞代謝のための重要な生化学的なエネルギーであり, 生存細胞においてのみ光合成や細胞呼吸の間に生み出されて, 生合成反応, 運動および細胞分裂などの細胞過程で消費される。そのため, 細胞内の ATP 量は細胞生存性と相関関係があり, 生細胞数の重要な指標となる[9]。Bio Assay Systems より購入した Enzy Light™ ATP assay kit を用い, Bio Assay Systems の推奨する方法に従い, 試料細胞を内皮細胞基本培地にて洗浄後に試薬調製液を入れ, ホタル・ルシフェラーゼ発光させた (Figure1-1)。ルシフェラーゼ発光反応は, ATP が必須因子であるため, 生じる発光量は ATP 量に比例する。この発光を Varioskan Flash マルチスペクトロマイクロプレートリーダー (Thermo) を用いて測定した。

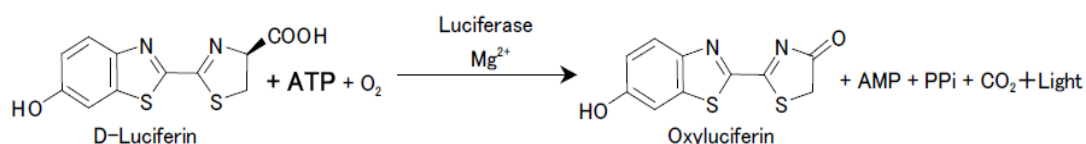


Figure1-1 ホタル・ルシフェラーゼ発光反応機構

1-5 JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位測定

Ψ_m は、ケイマンケミカル株式会社より購入した JC-1 mitochondrial potential assay kit を用いて測定した。JC-1 は脱分極したミトコンドリア内では凝集塊として蓄積して、赤色蛍光を発する（励起波長/蛍光波長=561 nm/594 nm）。しかしながら、ネクローシスやアポトーシス細胞では JC-1 は、単量体として存在し、緑色を呈する（励起波長/蛍光波長=485 nm/535 nm）。JC-1 は、脱分極したミトコンドリア内では緑色に、過分極したミトコンドリアでは赤色にその蛍光が可逆的に変化することで、ミトコンドリアの機能的状態を表し、 $\Delta\Psi_m$ は細胞毒性の早期の指標となる[10]。本実験では 25 $\mu\text{mol/L}$ JC-1 を 1 時間インキュベートし、膜電位測定に用いた。測定方法は株式会社ニコンの Bio Station IM を用いてランダムに撮影した 3 つの視野にある細胞の平均蛍光強度を Image J を用いて定量化し、比較した。

1-6 Fluo-4 AM を用いた細胞内カルシウム測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ はライフテクノロジーズジャパン株式会社より購入した Fluo-4 AM により測定した。3 $\mu\text{mol/L}$ の Fluo-4 AM で 1 時間インキュベートした後、株式会社ニコンの Bio Station IM を用いて蛍光強度を測定した（励起波長/蛍光波長=488 nm/526 nm）。Fluo-4 AM は脂溶性のアセトキシメチル基が導入されているため、細胞内へ容易に移行する。Fluo-4 AM は細胞内のエステラーゼにより加水分解され、水溶性の Fluo-4 となる。Fluo-4 は細胞膜を透過しにくいいため、細胞内に拡散し、 Ca^{2+} と錯体を形成して強い蛍光を発するようになる[11]。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は Image J を用いて、処置前の蛍光強度 (F_0) を基に経時的な変化 (F)

を測定した。Ca²⁺を含まない内皮細胞基本培地（Ca²⁺（-）培地）は5 mmol/L EGTA を添加することで作製し、Ca²⁺非存在下での実験条件ではこの培地を用いた[12]。実験では内皮細胞基本培地、Ca²⁺（-）培地、2 μmol/L ニフェジピンを含有する内皮細胞基本培地のそれぞれの条件下で、サンプル添加後5分間の Fluo-4 AM の蛍光強度の変化を測定した。

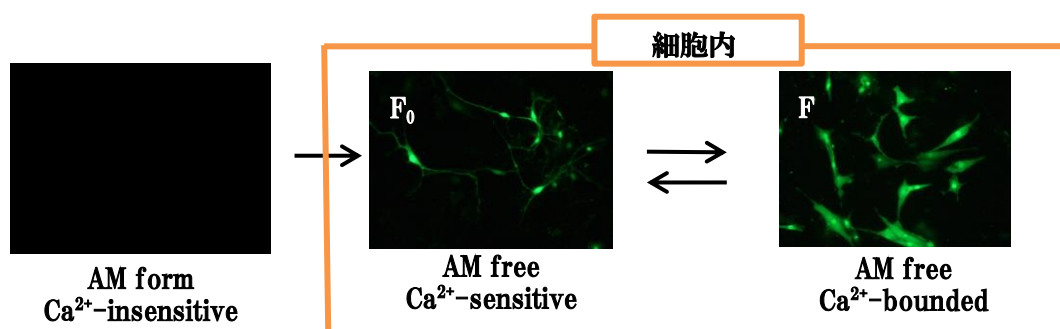


Figure1-2 Fluo-4 AM の発光反応機構

1-7 ウェスタンブロットによる Akt および eNOS のリン酸化比較

タンパク質の抽出は、内皮細胞基本培地で洗浄し、100 μl Lysis buffer（20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ ethylenediamine tetra acetic acid, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μg/ml leupeptin and 1 mM PMSF）を添加して細胞を溶解した。その後、セルスクレーパーで各ウェルの細胞溶解物を回収し、3 秒間×3 回、氷中で超音波破碎した（Handy Sonic UR-20P; Tomy Seiko Co.）。得られた細胞溶解液を 4 °C, 14,000 rpm×g で 20 分間遠心した後、上清を回収し、SDS-PAGE に用いた。使用したゲル濃度は 12.5% アクリルアミドゲル (eNOS), 8% アクリルアミド (Akt) を用いた。SDS-PAGE にてサンプルを分離した後、ニトロセルロースメンブレン（GE ヘル

スケア・ジャパン株式会社) にミニトランスブロット (バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社) を用いて転写した。1%BSA にてブロッキングを行い、特異的な 1 次抗体を加え反応させた (4°C, over night)。TBS-T で洗浄後、2 次抗体を加え反応させた (室温, 1 時間)。その後、ECL 試薬を用いて化学発光を検出し、Image J を用いてバンドの強度を数値化し、各タンパク質発現の比較検討を行った。

P-eNOS, eNOS , P-Akt, Akt の発現検討

1 次抗体 (1% BSA/TBS-T で希釈) : rabbit P-eNOS antibody (1:1000), rabbit eNOS antibody (1:1000), rabbit P-Akt antibody (1:1000), rabbit Akt antibody (1:1000)

2 次抗体 (1% スキムミルク/TBS-T で希釈) : anti-rabbit IgG (1:2000)

1-8 統計処理

データは 3 回以上行った実験結果を $\text{means} \pm \text{S. E.}$ で表した。グループ間の比較は一元配置分散分析を用い、各群の有意差は Dunnett-test で判定し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

第2節 結果

1-9 葛根湯構成生薬の VNR 誘発性細胞傷害に対する影響

VNR の細胞傷害性に対する葛根湯を構成する各生薬の影響を確認するため、HUVEC を各生薬抽出物含有培地で 2 時間インキュベートした後、内皮細胞基本培地を用いて 3 度洗浄し、生薬抽出物を完全に取り除いた後、3 μ M VNR を 24 時間処置した。3 μ M の VNR を 24 時間処置すると、未処理の HUVEC と比較して約 30 %程度まで細胞生存率が減少した。本実験ではマオウ抽出物を前処置した場合のみ VNR 単独処理と比較して有意に高い細胞生存が見られた。一方で、他の構成生薬成分は特に変わりがなかった。(Figure1-3,4)

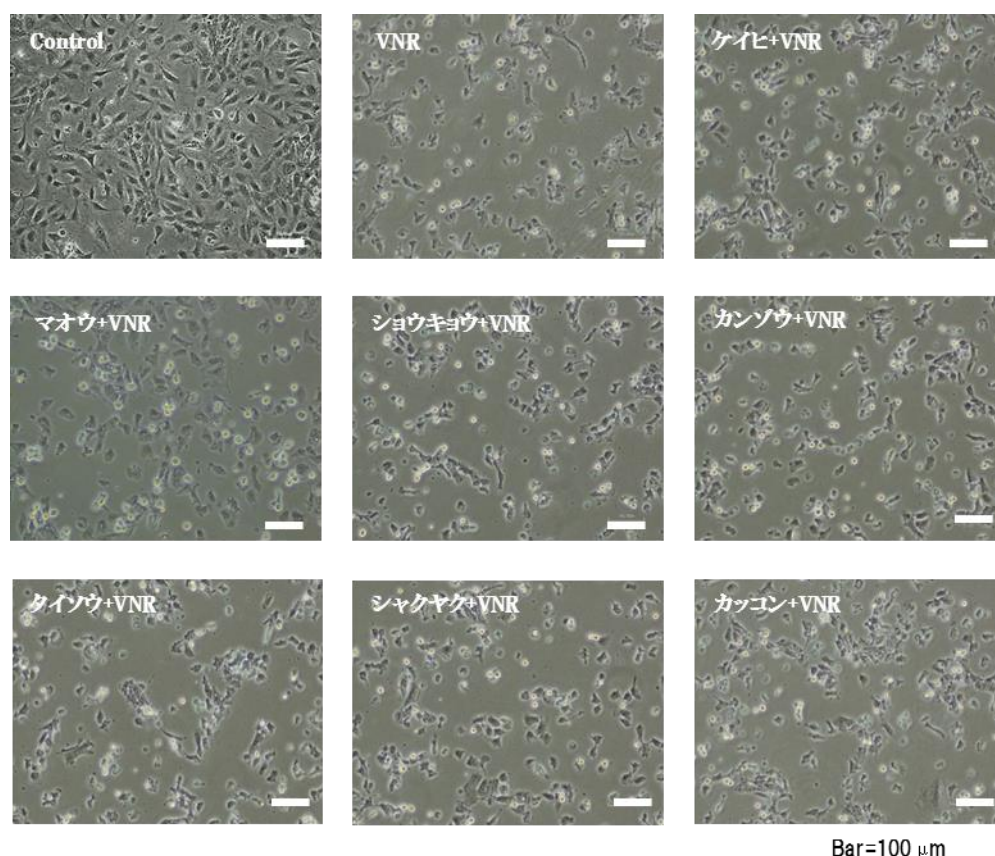


Figure1-3

VNR 誘発性細胞傷害に対する葛根湯構成生薬抽出物の影響（細胞数の変化）

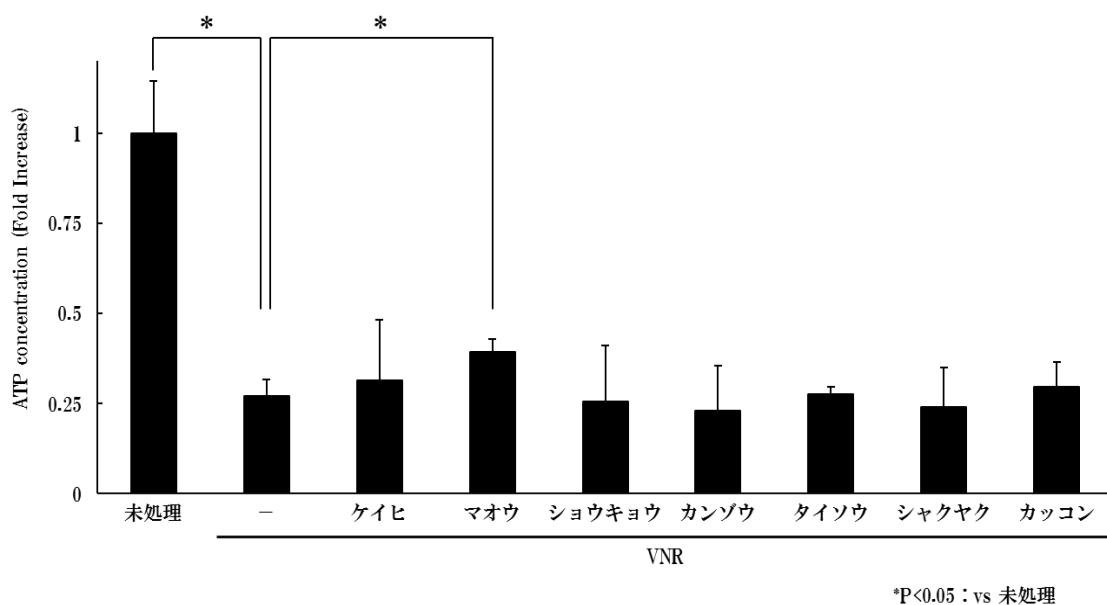
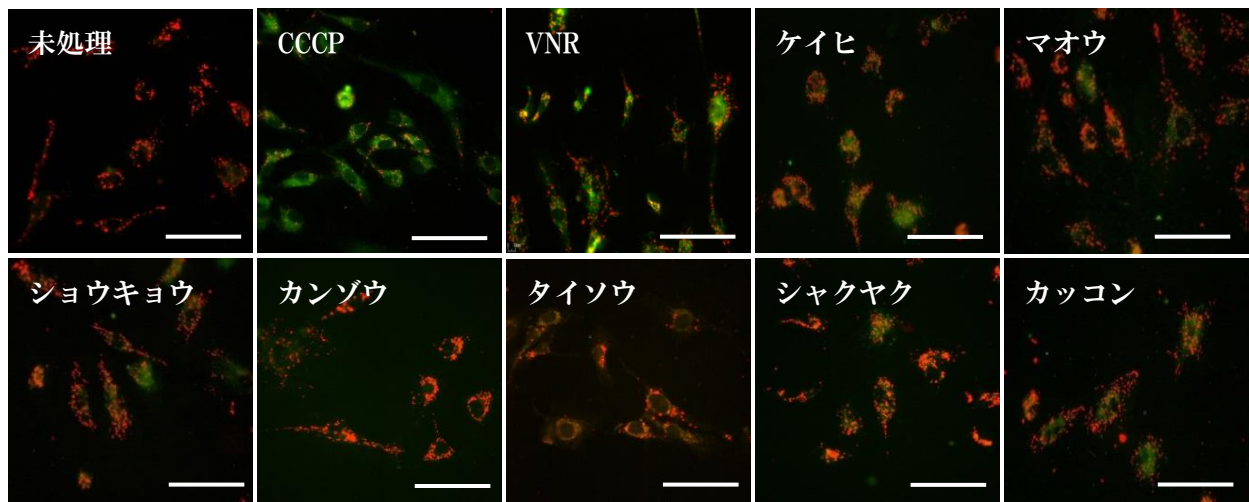


Figure1-4

VNR 誘発性細胞傷害に対する葛根湯構成生薬抽出物の影響 (ATP assay kit による測定)

1-10 葛根湯構成生薬によるミトコンドリア膜電位への影響

HUVEC に対して葛根湯構成生薬抽出物を 2 時間処置後、内皮細胞基本培地を用いて 3 回洗淨し、生薬抽出物を完全に取り除いた後、24 時間 VNR 処置した際の $\Delta\Psi_m$ を JC-1 mitochondrial potential assay kit を用いて測定した。CCCP はミトコンドリアの膜電位を脱共役させることで Ψ_m を低下させる脱共役剤であり、本実験ではポジティブコントロールとして用いた。全ての処置終了後の画像が Figure1-5 であり、それを Image J を用いて、赤色発光強度/緑色発光強度の比率に換算したグラフが Figure1-6 である。VNR 単独処置と比較して、有意な Ψ_m の低下が見られたのは未処理とマオウ抽出物、CCCP のみであった (Figure1-5,6)。



Bar=100 μ m

Figure1-5

ミトコンドリア膜電位における VNR 誘発性細胞傷害に対する葛根湯構成生薬抽出物の影響

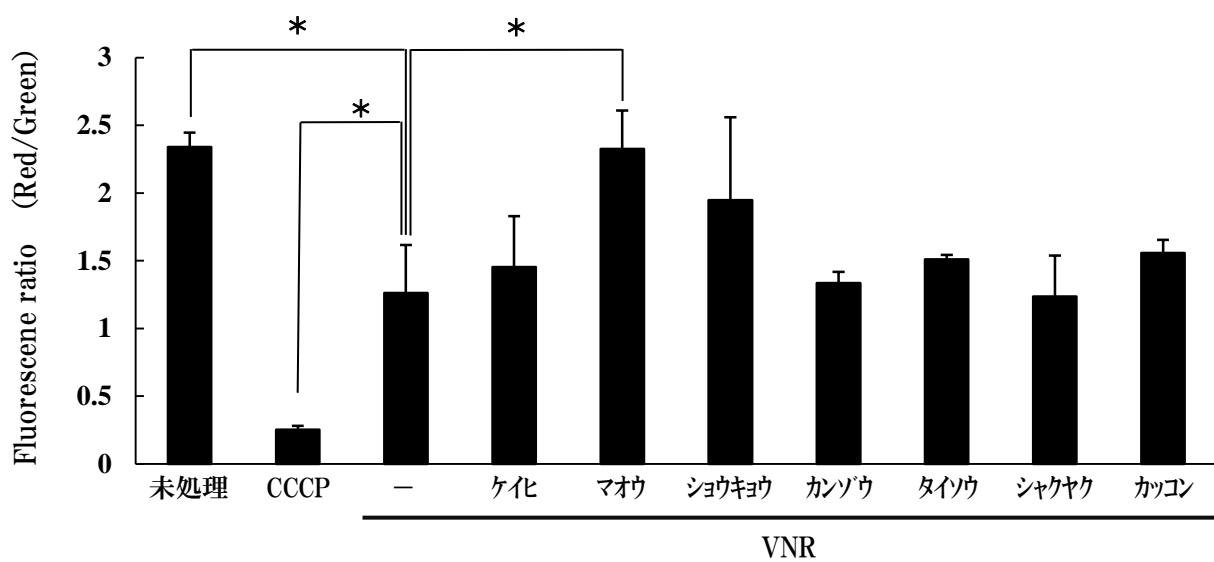


Figure1-6

ミトコンドリア膜電位における VNR 誘発性細胞傷害に対する葛根湯構成生薬抽出物の
蛍光強度比率に対する影響

1-11 マオウ抽出物による $[Ca^{2+}]_i$ および細胞への影響

前項の結果より 7 つの葛根湯構成生薬の中で細胞保護効果に最も関係があると示唆されたのはマオウ抽出物であった。このことより著者はマオウ抽出物についてより詳細な検討を行った。まず、 Ca^{2+} プローブである Fluo-4 AM を用いて 5 分間の $[Ca^{2+}]_i$ の変動を測定した。その結果、マオウ抽出物単独処置にて有意な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が見られた (Figure1-7 a)。それは時間を延長しても有意な差を持続した (Figure1-7 b)。さらに、 Ca^{2+} の流入経路探索のため、 Ca^{2+} 選択的キレート剤である EGTA 含有培地や L 型 Ca^{2+} ブロッカーであるニフェジピン含有培地を用いて同様の実験を行ったが、EGTA またはニフェジピン存在下ではその上昇は見られなかった (Figure1-7 c)。そこで、その変化が細胞へ与える影響を確認するため、1-9 と同様の実験方法にて VNR 添加前の前処置をマオウ抽出物単独処置、マオウ抽出物 + EGTA 処置、マオウ + ニフェジピン処置へ変更し、VNR 誘発性細胞傷害についての影響を検討した結果、EGTA またはニフェジピン併用下では VNR 単独処置と差がなかった (Figure1-7 c)。また 1.25 mg/mL マオウ抽出物中に含まれるエフェドリン推定濃度(8.75×10^{-3} mg/mL)を用いて同様の実験を行ったが、マオウ抽出物とエフェドリンは異なる $[Ca^{2+}]_i$ の変化を示した (Figure1-7 d)。

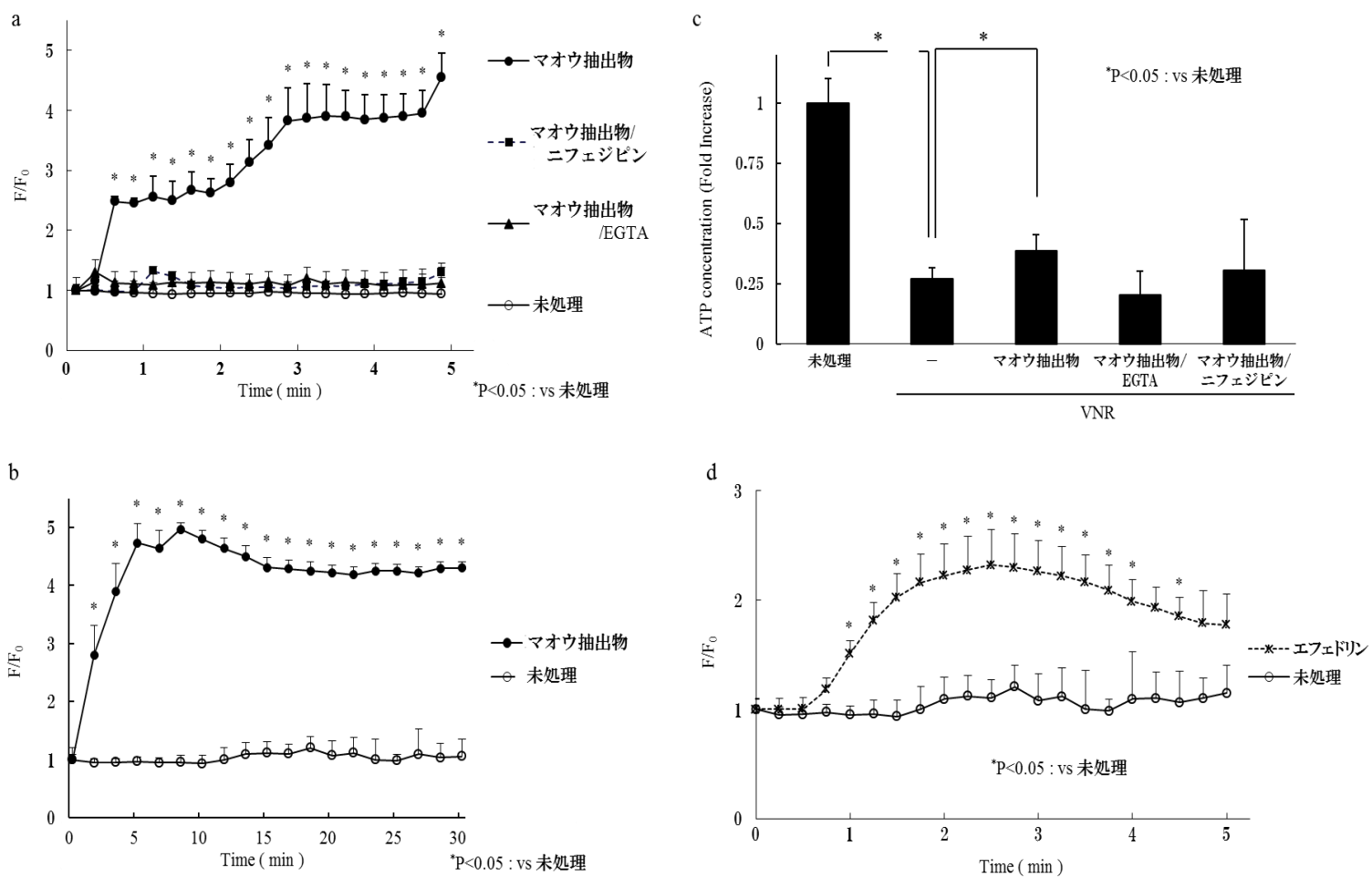


Figure1-7

マオウ抽出物による細胞内カルシウムおよび VNR 誘発性細胞傷害に対する変化

a : マオウ抽出物、ニフェジピン、EGTA を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 変化 (5 分間)

b : マオウ抽出物による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の持続検討 (30 分間)

c : VNR 誘発性細胞傷害に対するマオウ抽出物、ニフェジピン、EGTA の前処置の影響

d : エフェドリンによる $[Ca^{2+}]_i$ の変化

1-12 VNR による eNOS のリン酸化阻害に対するマオウ抽出物の影響

VNR による酸化ストレスにより引き起こされる eNOS のリン酸化阻害に対するマオウ抽出物の影響を検討するためウエスタンブロットにて eNOS のリン酸化割合の変化を測定した。eNOS のリン酸化を促進し、NO 産生を増加させるポジティブコントロールとして BK を用いた[13]。その結果、VNR による eNOS のリン酸化阻害に対してマオウ抽出物の前処置することでリン酸化阻害を軽減することが明らかになった。さらに、その反応は細胞外 Ca^{2+} が存在しない環境や Ca^{2+} ブロッカーであるニフェジピン存在下では起きなかった (Figure1-8 a)。さらに、ウエスタンブロットにて Akt のリン酸化割合を検討した結果、マオウ抽出物の前処置による Akt のリン酸化割合に変化はなく、VNR による Akt のリン酸化抑制に対しマオウ抽出物の抑制効果はなかった (Figure1-8 b)。インスリンは Akt をリン酸化させるポジティブコントロールとして用いた[14]。

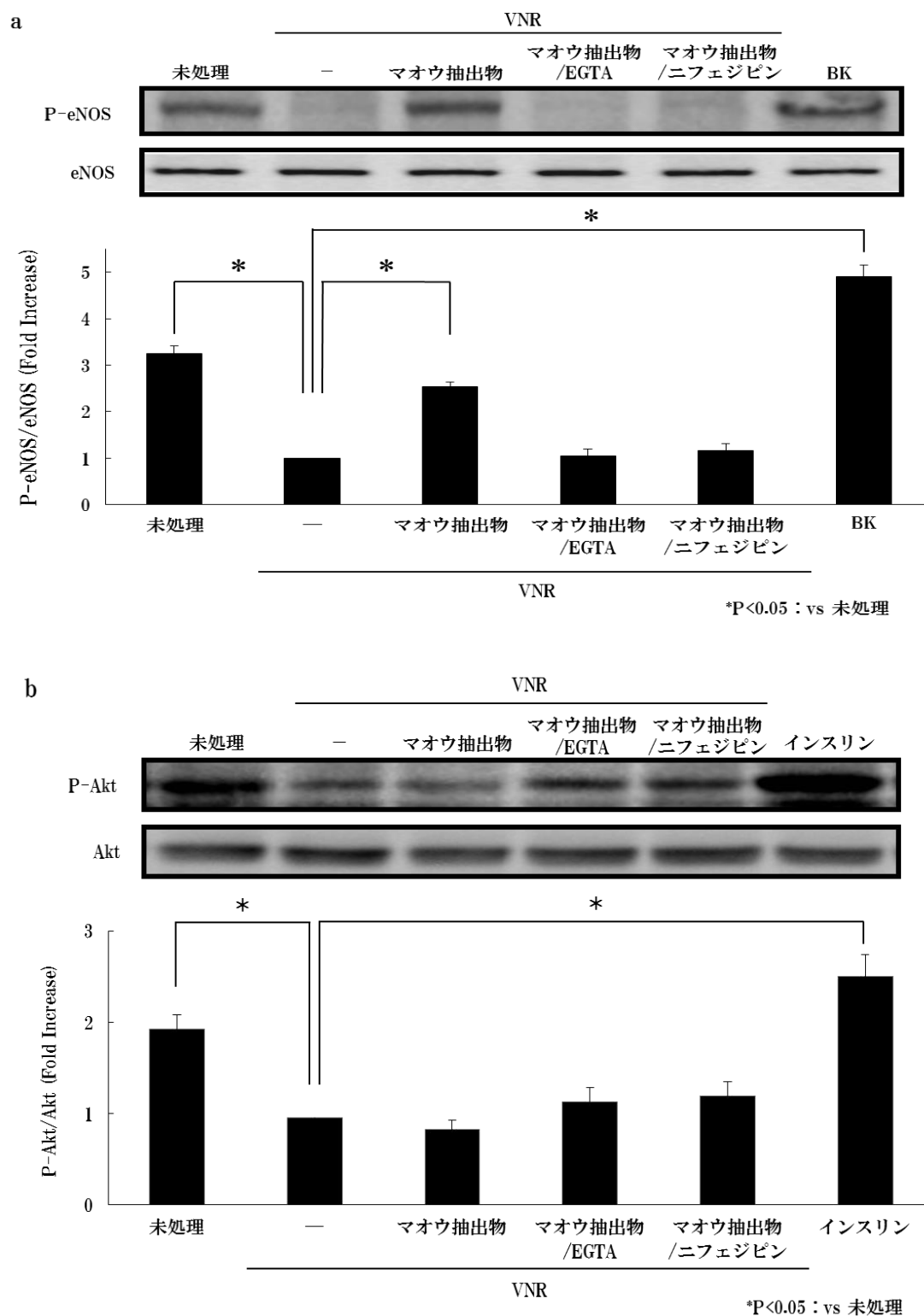


Figure1-8 VNR 誘発性リン酸化障害に対するマオウ抽出物前処置の影響

a : マオウ抽出物による eNOS のリン酸化比率の変化に関する検討

b : マオウ抽出物による Akt のリン酸化比率の変化に関する検討

第3節 考察

VNR は様々ながん種に幅広く使用される重要な抗がん剤であるが、ROS の産生増加、eNOS のリン酸化抑制や NO 産生抑制を介して血管内皮細胞に障害を起こし、静脈炎や血管痛などの血管障害を起こすという副作用がある。しかし、この副作用に対する有効な対策は未だ確立されていない。最近、牛車腎気丸などいくつかの生薬が L-OHP など特定の抗がん剤の副作用対策として有効であるとの報告がある[3]。他にも植物由来の epicatechin とその代謝物が内皮細胞において直接的な抗酸化作用を示した報告などがある[15]。これらの報告から著者は血管痛などの原因である血管内皮細胞に起こる VNR 誘発性の細胞傷害に対し抗炎症作用を持つ葛根湯の構成生薬抽出物が保護効果を有するという仮説を立て、血管内皮細胞を用いて検証を行った。著者はまず、葛根湯構成生薬の前処置による VNR の細胞障害について ATP assay を用いて検討し、マオウ抽出物の前処置を行うことで VNR による細胞致死率が減少することを明らかにした (Figure1-3,4)。ミトコンドリアにおいて低濃度の ROS は間接的な伝達物質であるが、高濃度の ROS は Ψ_m の脱共役やミトコンドリア因子の放出、カスパーゼカスケードの活性化に関わっており、VNR による ROS の産生増加も Ψ_m の脱共役を介して細胞障害を引き起こすことが確認されている[16, 17]。そこで次に各葛根湯構成生薬を処置し、VNR を添加した後の Ψ_m の変化を観察したところ、マオウ抽出物を前処置することで VNR により誘発される細胞毒性だけでなく、脱共役作用も減弱されることを確認した (Figure1-5,6)。これらの結果は VNR 処置後の生存細胞は、正常な ROS 産生やカルシウムホメオスタシスを維持できており、細胞毒性に対する制御が行えた可能性を

示し、マオウ抽出物が細胞保護効果を有する可能性を示唆した。そのため、これ以降の実験に関してはマオウ抽出物のみ使用し、検証を続けた。過去に Ladurner らは、ヒト血管内皮細胞において $[Ca^{2+}]_i$ 上昇による eNOS の活性化を介した保護効果について報告した[18]。そこで、著者は Ψ_m の調節をはじめ F-アクチンの変化や eNOS の調節など様々な細胞過程に関与する $[Ca^{2+}]_i$ の変化を評価した。Fluo-4 AM を用いて $[Ca^{2+}]_i$ を測定した結果、HUVEC においてマオウ抽出物により細胞外からの Ca^{2+} 流入が起きること、およびその流入が VNR の細胞毒性の軽減に関与している可能性を見出した (Figure1-7)。しかし、本実験で用いた Fluo-4 AM は $[Ca^{2+}]_i$ の相対的变化を測定した結果であり、絶対的な濃度変化を示すものではないことに留意する必要がある。eNOS のリン酸化経路は $[Ca^{2+}]_i$ に非依存的な Akt のリン酸化により活性化する Akt 経路とリン酸化に Ca^{2+} 依存的な AMPK 経路である[19-21]。上記の 2 つの経路により内皮細胞において eNOS のリン酸化が促進されると、ROS の働きの抑制や炎症反応の抑制、NO 産生の増加につながる[7]。反対に eNOS のリン酸化が減少すると、血管障害や血管疾患の進展につながる事が報告されている[22]。本研究においてこれらの経路のどちらがマオウ抽出物による eNOS のリン酸化に関与したのかを解析したところ、Akt 経路ではなく、AMPK 経路であることが示唆された (Figure1-8)。つまり、VNR 誘発性血管内皮細胞障害に対してマオウ抽出物は AMPK 経路を介した eNOS のリン酸化維持により血管内皮細胞を保護し、血管障害を改善する可能性が示唆された (Figure1-9)。2008 年に Li らにより内皮細胞において植物由来のタンニン類似物質がホスファチジルイノシトール

3-キナーゼ/Akt 経路を介した Ca^{2+} 依存的な eNOS のリン酸化の促進を誘導することが報告された[23]。マオウもタンニンを多く含有している点やマオウ抽出物の主成分であるエフェドリン単独では同様の実験結果を得られなかった点からマオウ抽出物中のポリフェノール骨格を有する化合物が関与している可能性が大きいと考えられ、化合物の更なる同定が必要である。また、この血管内皮保護作用は eNOS に関与することから加齢やたばこなどによる血管内皮障害の軽減にも応用できる可能性があると共に、薬理作用などの基礎研究が不十分である生薬分野におけるエビデンス解明に寄与するものと考ええる。

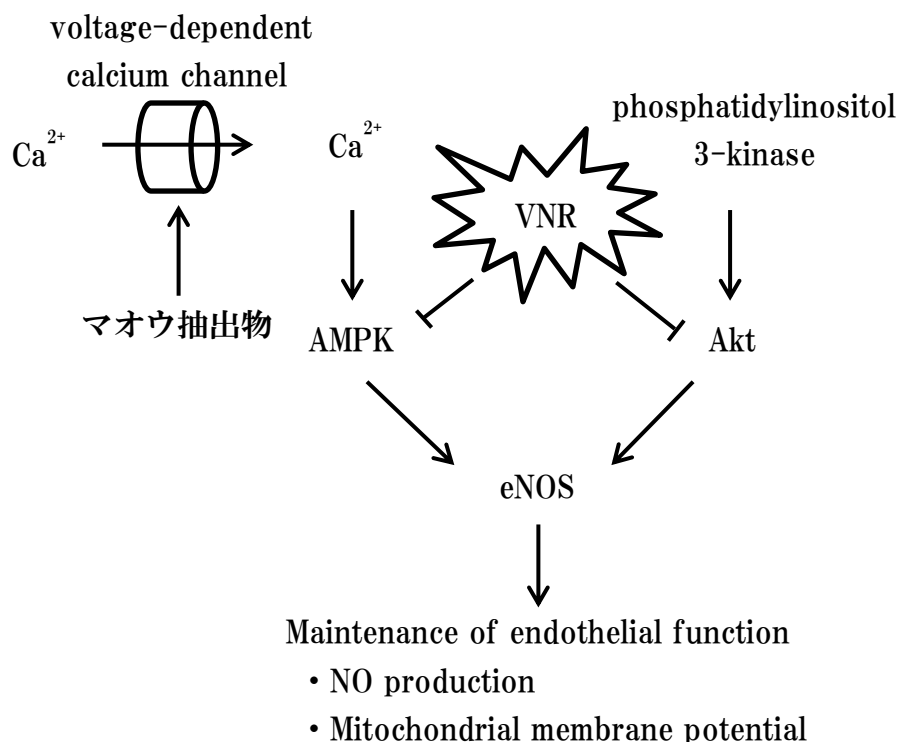


Figure 1-9 VNR 誘発性 eNOS リン酸化障害に対するマオウ抽出物の作用機序

第 2 章 神経様細胞における PTX 誘発性末梢神経障害に対する漢方薬の修復促進効果に関する検討

セイヨウイチイ由来の PTX は広範な固形がんで標準治療として使用されるキードラッグであるが、副作用として投与開始直後あるいはある程度の期間を経て CIPN を誘発する。それらを合わせた割合は 50%を超えるとの報告もあり、CIPN が用量規制毒性となり治療に影響することが問題となっている[24, 25]。PTX の薬理作用は微小管を安定化させ、脱重合阻害することで抗腫瘍効果を発揮するが、神経を構成する微小管にもこの効果が及ぶため、細い末端の神経線維から中心の核に向かって神経障害を引き起こすことが知られている (Figure2-1) [26]。

漢方薬の 1 つである芍薬甘草湯は筋肉のけいれんを伴う疼痛や関節痛に適応を持ち、臨床現場では以前より筋肉痛や吃逆に使用されていた。近年、Hidaka らが芍薬甘草湯のマウスにおける PTX 誘発性のアロディニア抑制効果を報告したが、適応追加に至るまでのエビデンスとはなっていない[27]。芍薬甘草湯のアロディニア抑制の機序についての検討は行われておらず、更なるエビデンスの蓄積や機序の解明が必要とされる。また、同じく漢方薬の 1 つである加味逍遙散は芍薬甘草湯と同一生薬を構成生薬として含み、冷え症や精神神経症状に適応を持つ。このことより本研究では in vitro における機序解明および有用な新規生薬製剤の発見のため、この 2 つの生薬製剤抽出物および L-OHP による CIPN の抑制にエビデンスのある牛車腎気丸を用いた[3]。

PC12 細胞はラット副腎髄質より単離されたクロム親和性褐色細胞腫であり，NGF に応答して交感神経様に分化することから，神経分化や突起進展のモデル細胞として有用である [28]。本研究ではこの PC12 細胞を用いて加味逍遥散，芍薬甘草湯，牛車腎気丸の PTX 誘発性神経障害に対する生薬成分の影響および作用機序についての検討を行った。

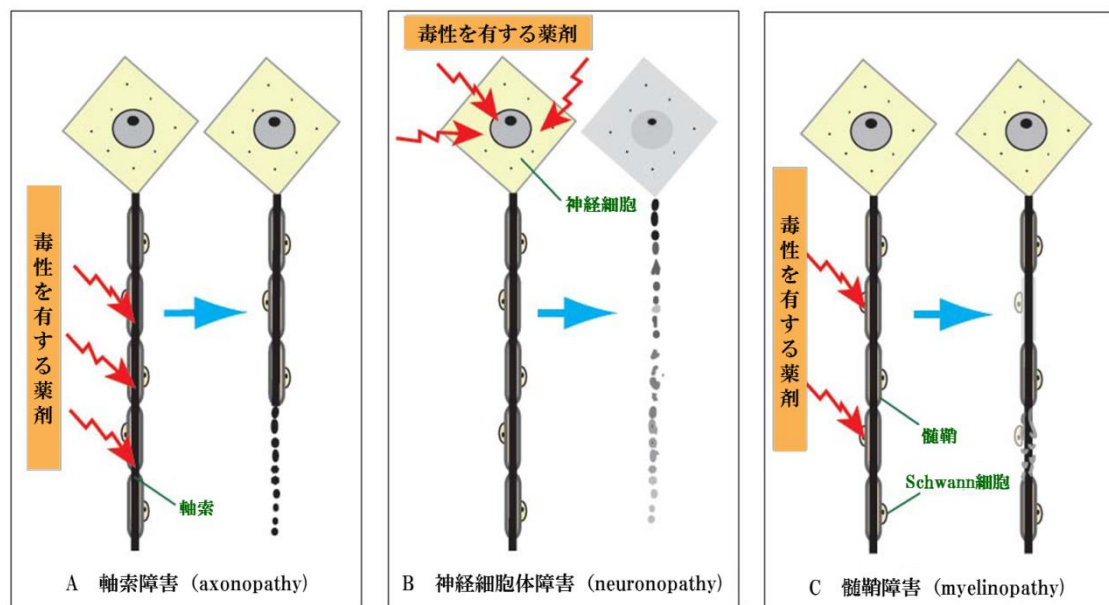


Figure2-1 薬剤性末梢神経障害の発生機序の模式図

- A. 軸索障害 (axonopathy) :軸索が一次的に障害され，神経細胞体が比較的保たれる．二次的に髄鞘が傷害される．
 B. 神経細胞体障害 (neuronopathy) :神経細胞体が一次的に障害され，軸索や髄鞘が傷害される
 C. 髄鞘障害 (myelinopathy) :髄鞘，すなわち Schwann 細胞が一次的に障害され，軸索と神経細胞体に保たれる．接性脱髄所見を呈する。
 (厚生労働省重篤副作用疾患別マニュアルより抜粋)

第1節 実験材料および実験方法

2-1 試薬

PC12 細胞, PC/SM は DS ファーマバイオメディカル, DMEM, amplite colorimetric acetylcholinesterase assay kit はナカライテスク株式会社, FBS, HS はバイオウエスト株式会社, NGF, GAP-43 抗体はメルク株式会社, ツムラ加味逍遙散エキス顆粒 (医療用) (以下, TJ24), ツムラ芍薬甘草湯エキス顆粒 (医療用) (以下, TJ68), ツムラ牛車腎気丸エキス顆粒 (医療用) (以下, TJ107) は株式会社ツムラより購入した. MTT 試薬, DMSO, PMSF, PTX, エフェドリンは和光純薬工業株式会社, NF-L 抗体はノバスバイオリジカルズ株式会社, P-Erk 抗体, Erk 抗体, P-Akt 抗体, Akt 抗体, β アクチン抗体, U0126, LY294002 は CST ジャパン株式会社, ECL ウェスタンブロッティング検出試薬は GE ヘルスケア・ジャパン株式会社より購入した.

2-2 細胞培養

培養は 37°C, 5%CO₂ 条件下でコラーゲン I コートされたプレートまたはディッシュを用いて行った. PC12 細胞の増殖培養は 10%FBS, 5%HS, 1%PC/SM を含有した DMEM (培養培地) を用い, 分化培養は 0.5% FBS, 1% HS, 1% PC/SM, 50ng/mL NGF を含有した DMEM (分化培地) を用いた. PC12 細胞の神経様細胞への分化誘導は 1.0×10^4 cells/cm² で播種後, 24 時間増殖培養し, その後 DMEM で 1 回洗浄し, 72 時間分化培養を行った. また A549 細胞は 10% FBS, 2% PC/SM を含有した DMEM を用いて, 1.5×10^4 cells/cm² で播種し, 24 時間培養したものを実験に用いた.

2-3 漢方製剤サンプルの作製

各漢方顆粒製剤 2.5 g を 100 mL の水で懸濁し加熱してできる限り溶解した (Table2-1)。

その後、フィルターを用いて不溶物を取り除き、さらに不要画分を取り除くために 10,000×g

(室温) で 20 分遠心後、上清を回収した。添加する際は適宜、1mg (製剤量) /mL となる

ように培地で希釈して用いた。

Table 2-1 各漢方製剤エキス成分

TJ24	①サイコ (1.5g) ②シャクヤク (1.5g) ③ソウジュツ (1.5g) ④ブクリョウ (1.5g) ⑤トウキ (1.5g) ⑥ボタンピ (1g) ⑦サンシシ (1g) ⑧カンゾウ (0.75g) ⑨ショウキョウ (0.5g) ⑩ハッカ (0.5g)	7.5g 中、左記の割合の 混合生薬の乾燥エキ ス 2.0g を含有する。
TJ68	①カンゾウ (6g) ②シャクヤク (6g)	7.5g 中、左記の割合の 混合生薬の乾燥エキ ス 1.25g を含有する。
TJ107	①ジオウ (5g) ②タクシャ (3g) ③ゴシツ (3g) ④ブクリョウ (3g) ⑤サンシュユ (3g) ⑥ボタンピ (3g) ⑦サンヤク (3g) ⑧ケイヒ (1g) ⑨シャゼンシ (3g) ⑩ブシ末 (1g)	7.5g 中、左記の割合の 混合生薬の乾燥エキ ス 4.5g を含有する。

2-4 MTT assay による細胞傷害の評価

測定する細胞を DMEM で 1 回洗浄し、0.5 mg/mL MTT 試薬を含有した DMEM で 4 時間

インキュベートを行った。培地を除き、DMSO 500 μ L を加えて細胞内のホルマザンを溶解

し、上清 200 μ L を 96 穴プレートに移し、マイクロプレートリーダー (TECAN infinite[®] F50R)

を用いて 570 nm の吸光度を測定した[29]。

2-5 神経突起伸展の評価

細胞を位相差顕微鏡（NICON ECLIPSE TS100）にて観察し、顕微鏡用デジタルカメラ Digital Sight（NICON DS-Fi2）を用いて画像を取得した。神経突起伸展は Image J を用いて、画像内の軸索、樹状突起を合わせた神経突起の総和を算出し、その値を全細胞数で割ったもので評価した。

2-6 タンパク質の抽出

DMEM で洗浄し、100 μ l Lysis buffer（20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF）を添加して細胞を溶解した。その後、セルスクレーパーで各ウェルの細胞溶解物を回収し、3 秒間×3 回、氷中で超音波破碎した（Handy Sonic UR-20P; Tomy Seiko Co.）。得られた細胞溶解液を 4 °C, 14,000 rpm×g で 20 分間遠心した後、上清を回収した。

2-7 ウェスタンブロットを用いた Akt および Erk のリン酸化の比較

SDS-PAGE により 10%アクリルアミドゲル(Akt), 12.5%アクリルアミド(GAP-43, NF-L, Erk) にサンプルを展開し、ニトロセルロースメンブレン（GE Healthcare Japan）にミニトランスブロット（Bio-Rad）を用いて転写した。GAP-43, NF-L, β -アクチン測定時はスキムミルク、リン酸化比較時は BSA によりブロッキングを行い、特異的な 1 次抗体を加え、反応させた（4°C, over night）。PBS および TBS で洗浄後、2 次抗体を加え反応させた（室温,

1 時間)。その後、ECL 試薬を用いて化学発光を検出し、Image J を用いてバンドの強度を数値化した。

Phospho-Erk (P-Erk), Erk , Phospho-Akt (P-Akt), Akt, の発現検討

1 次抗体 (1% BSA/TBS-T で希釈) : rabbit P-Erk1/2 antibody (1:1000), rabbit Erk1/2 antibody (1:1000), rabbit P-Akt antibody (1:1000), rabbit Akt antibody (1:1000)

2 次抗体 (1% スキムミルク/TBS-T で希釈) : anti-rabbit IgG (1:2000)

GAP-43, β -actin の発現検討

1 次抗体 (1% スキムミルク/PBS-T で希釈) : rabbit anti-GAP-43 antibody (1:500), rabbit anti- β -actin antibody (1:1000)

2 次抗体 (1% スキムミルク/PBS-T で希釈) : anti-rabbit IgG (1:1000)

NF-L, β -actin の発現検討

1 次抗体 (1% スキムミルク/PBS-T で希釈) : mouse anti-NF-L antibody (1:1000) rabbit anti- β -actin antibody (1:1000)

2 次抗体 (1% スキムミルク/PBS-T で希釈) : anti-mouse IgG (1:1000), anti-rabbit IgG (1:1000)

2-8 AChE の測定

PC12 細胞を PBS で洗浄後、細胞剥離液 (0.12M NaCl, 0.2% Triton-X-100, 1mM EDTA, 50mM HEPES, pH7.5) を 100 μ L 添加して細胞を剥離した。その後セルスクレーパーで細

胞溶解物を回収し、3 秒間×3 回、水中で超音波破碎した。得られた細胞溶解液を 4℃、14,000 rpm×g で 20 分間遠心した後、amplite colorimetric acetylcholinesterase assay kit により上清の AChE 活性を測定した。この kit は Ellman 法を応用した AChE 活性を測定することができる kit であり、測定手順は assay kit のプロトコールに準じて行った (Figure2-2) [30]。

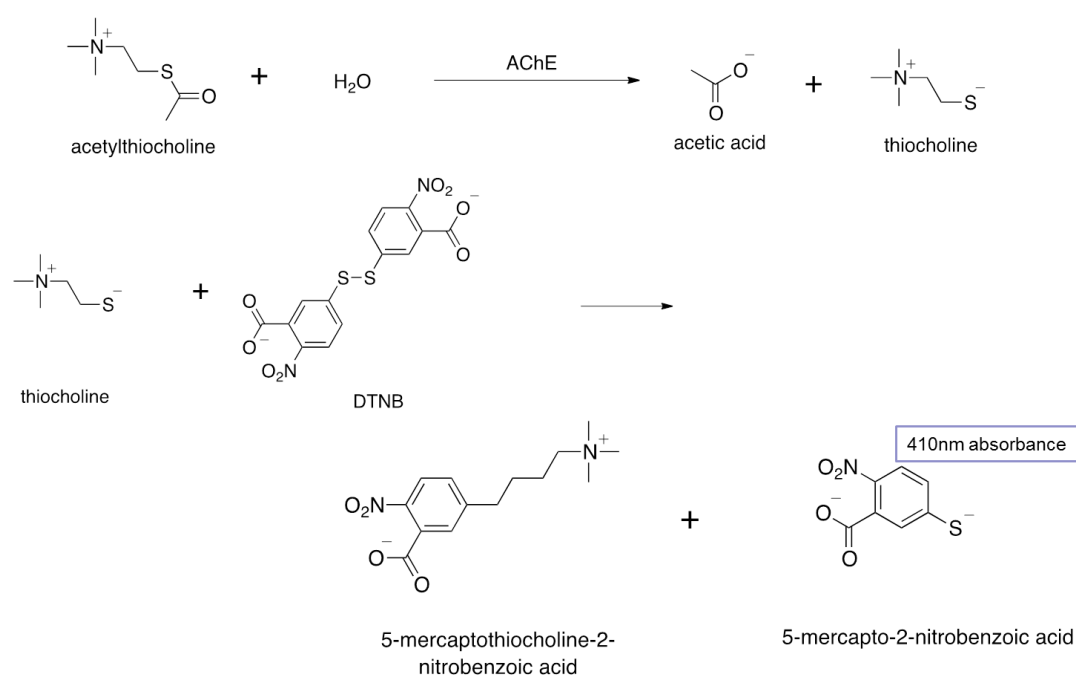


Figure2-2 アセチルコリンエステラーゼ測定方法

2-9 統計処理

データは 3 回以上行った実験結果のそれぞれの数値を $\text{means} \pm \text{S. E.}$ で表した。グループ間の比較は一元配置分散分析を用い、各群の有意差は Dunnett-test で判定し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であると判定した。

第2節 結果

2-10 PTX 誘発性神経障害モデル細胞の作製

PTX により神経障害を誘発させるため、神経様細胞へ分化誘導した PC12 細胞に 0~100 μM PTX を添加し、24 時間培養した[31, 32]。その結果、1 μM PTX にて細胞生存率に影響を与えることなく、有意に神経突起が退縮することを確認した (Figure2-3)。また、神経分化マーカーである GAP-43 および NF-L のタンパク質発現は 1 μM PTX の添加により有意に減少したことが確認された (Figure2-4)。本研究では、上記の方法で神経突起の退縮を惹起させた PC12 細胞を PTX 誘発神経障害モデル細胞として用いた。

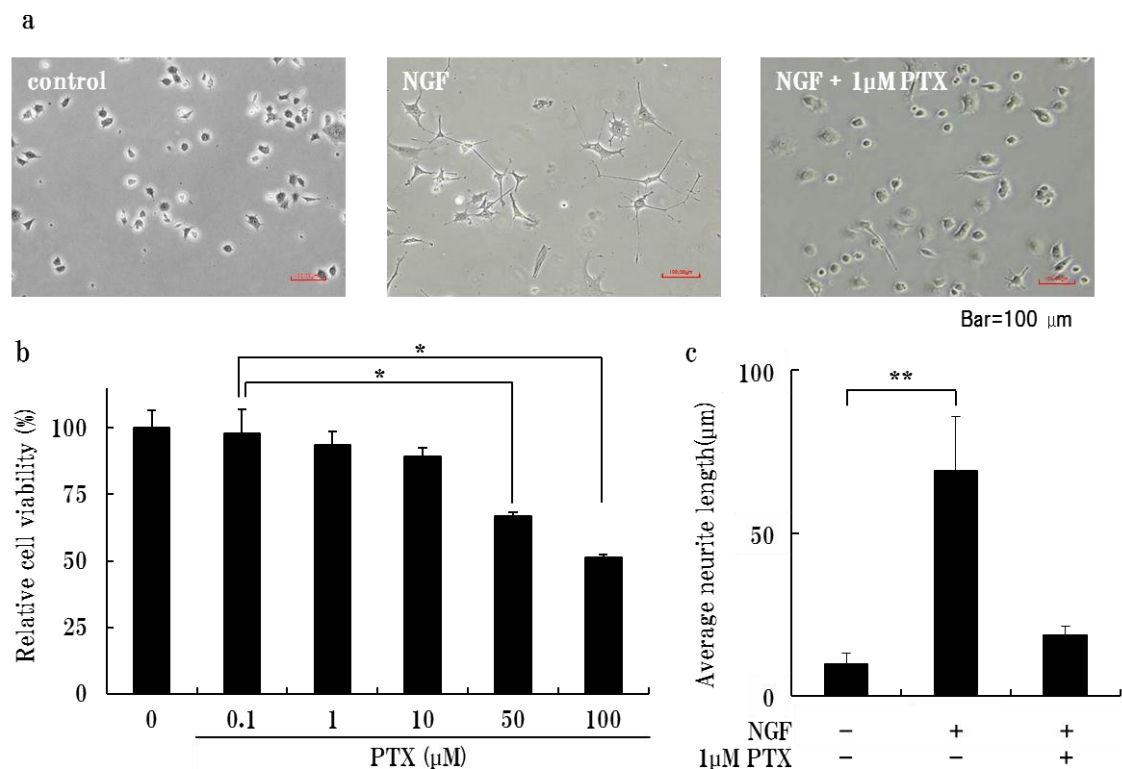


Figure2-3 PC12 細胞における PTX の影響

- a : PC12 細胞の神経突起伸長に対する PTX の形態的变化
- b : PC12 細胞における濃度別 PTX の細胞障害
- c : PC12 細胞の樹状突起伸長に対する PTX の影響

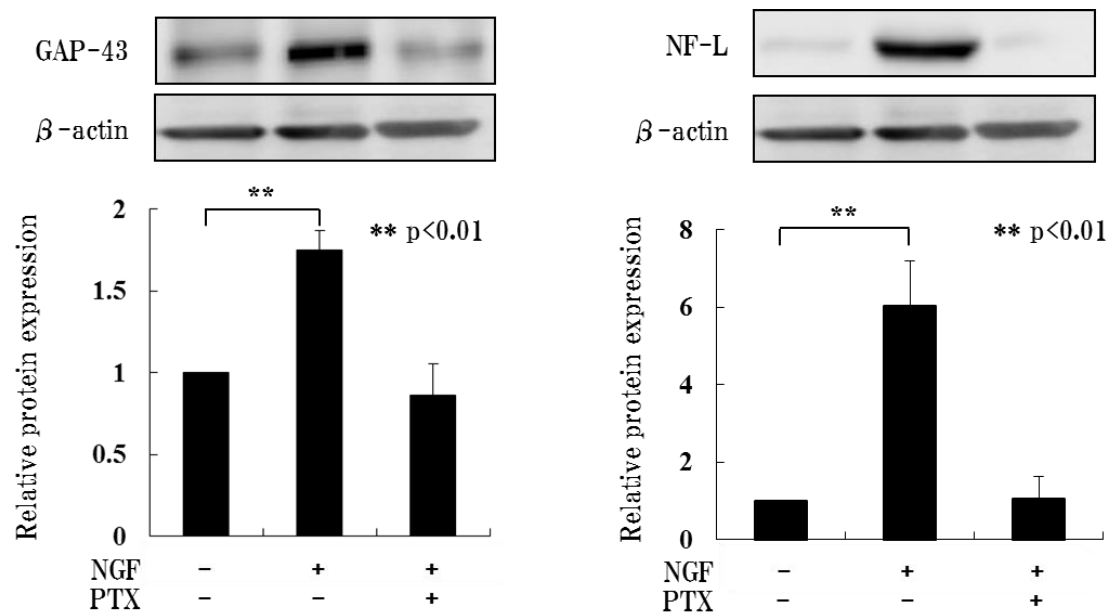


Figure2-4 PC12 細胞における 1μM PTX の神経突起退縮作用

2-11 PTX 誘発性神経障害に対する漢方薬の影響

上記方法にて作製した神経障害モデルに NGF, NGF+TJ24, NGF+TJ68, NGF+TJ107 を添加し, 72 時間後の神経突起の回復効果を比較した。その結果, NGF 単独群と比較して NGF と TJ24, TJ68 を併用した群が有意に神経突起の伸長を促進し (Figure2-5 a), GAP-43 および NF-L のタンパク質発現も有意に増加させた (Figure2-5 b,c)。また, 神経様細胞としての回復を形態学的な神経突起の伸長だけでなく, acetylcholinesterase assay kit を用いてアセチルコリンエステラーゼの分泌量を測定することで機能学的にも評価した[33]。その結果, TJ24, TJ68 を併用した群が有意に神経様細胞として回復していることを確認した (Figure2-5 d)。しかし, TJ107 を併用した群に関してはどの実験においても未処理と比較して有意な差は見られなかった。

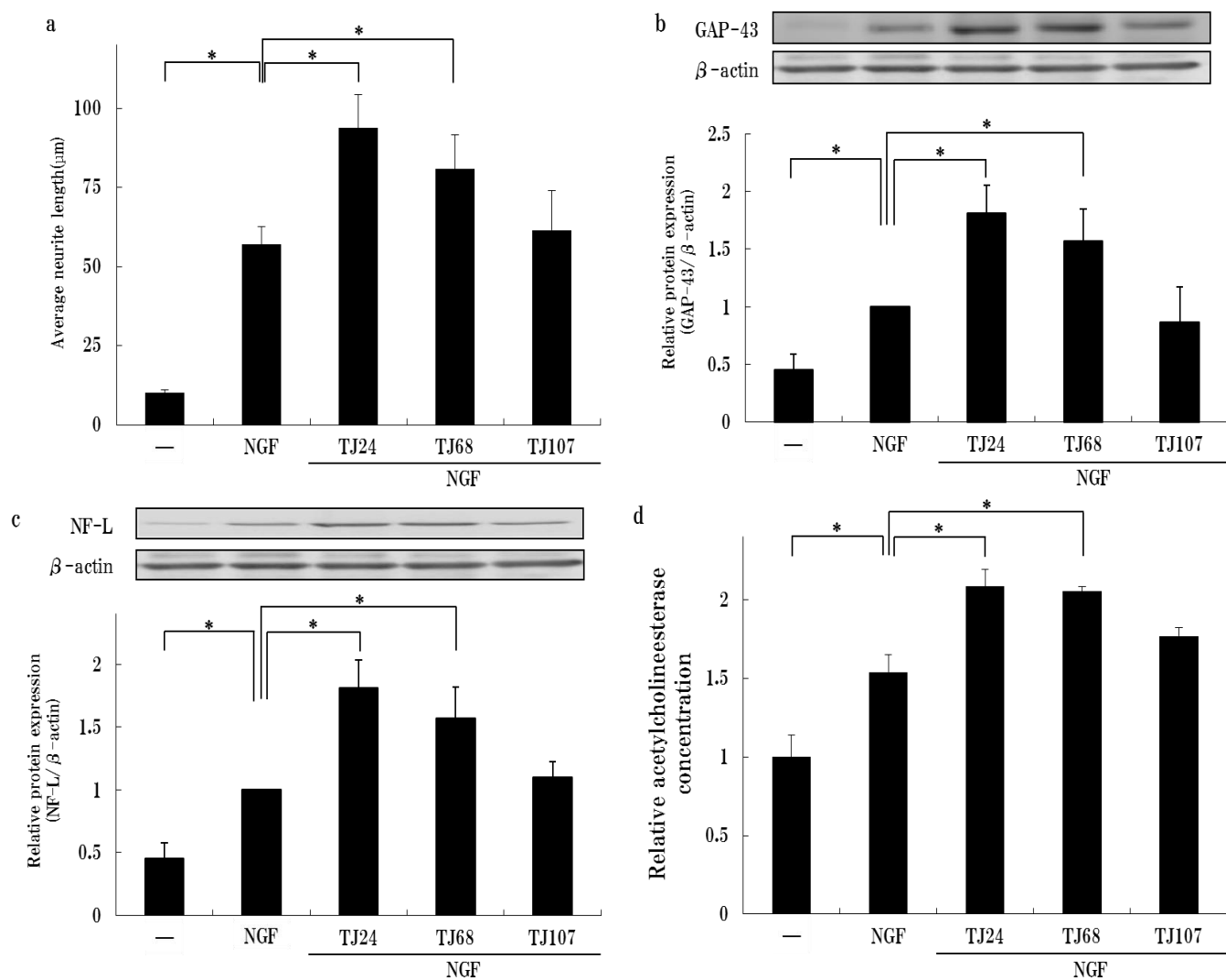


Figure2-5 PTX 誘発神経突起退縮からの回復に関する構造的および機能的比較

a：神経突起再生に対する各漢方薬の神経突起伸長に与える影響

b：神経突起再生に対する各漢方薬の GAP-43 発現量に与える影響

c：神経突起再生に対する各漢方薬の NF-L 発現量に与える影響

d：神経突起再生に対する各漢方薬のアセチルコリンエステラーゼ発現量に与える影響

2-12 神経突起伸長促進作用に関するシグナル経路における漢方薬の影響

各生薬抽出物がPC12細胞の神経突起伸長に関与するシグナル経路にどのような影響を与えるか解析するために、様々なシグナル経路の阻害薬を添加して、解析を行った。NGF, NGF+TJ24, NGF+TJ 68 の3群にて72時間分化培養を行い、神経突起の長さを比較した結果、TJ24 併用群および TJ68 併用群において、NGF 単独群よりも有意な神経突起の伸長が見られた (Figure2-6 a,b)。さらに、その神経突起の伸長促進に関与する経路を探索するためにMEK キナーゼ活性を阻害し ERK 1/2 の活性化を抑制する U0126 およびホスファチジルイノシトール 3-キナーゼを阻害し Akt の活性化を抑制する LY294002 を用いて再度、同様の実験を行った。その結果、U0126 および LY294002 存在下においても、両漢方薬処置により、NGF 単独群よりも有意に神経突起を伸長させた (Figure2-6 c,d)。これらのことより、TJ24 および TJ68 による神経突起伸長促進作用は NGF による神経突起伸長に大きく関与する Erk 経路および Akt 経路の両方に作用している可能性が示唆された。

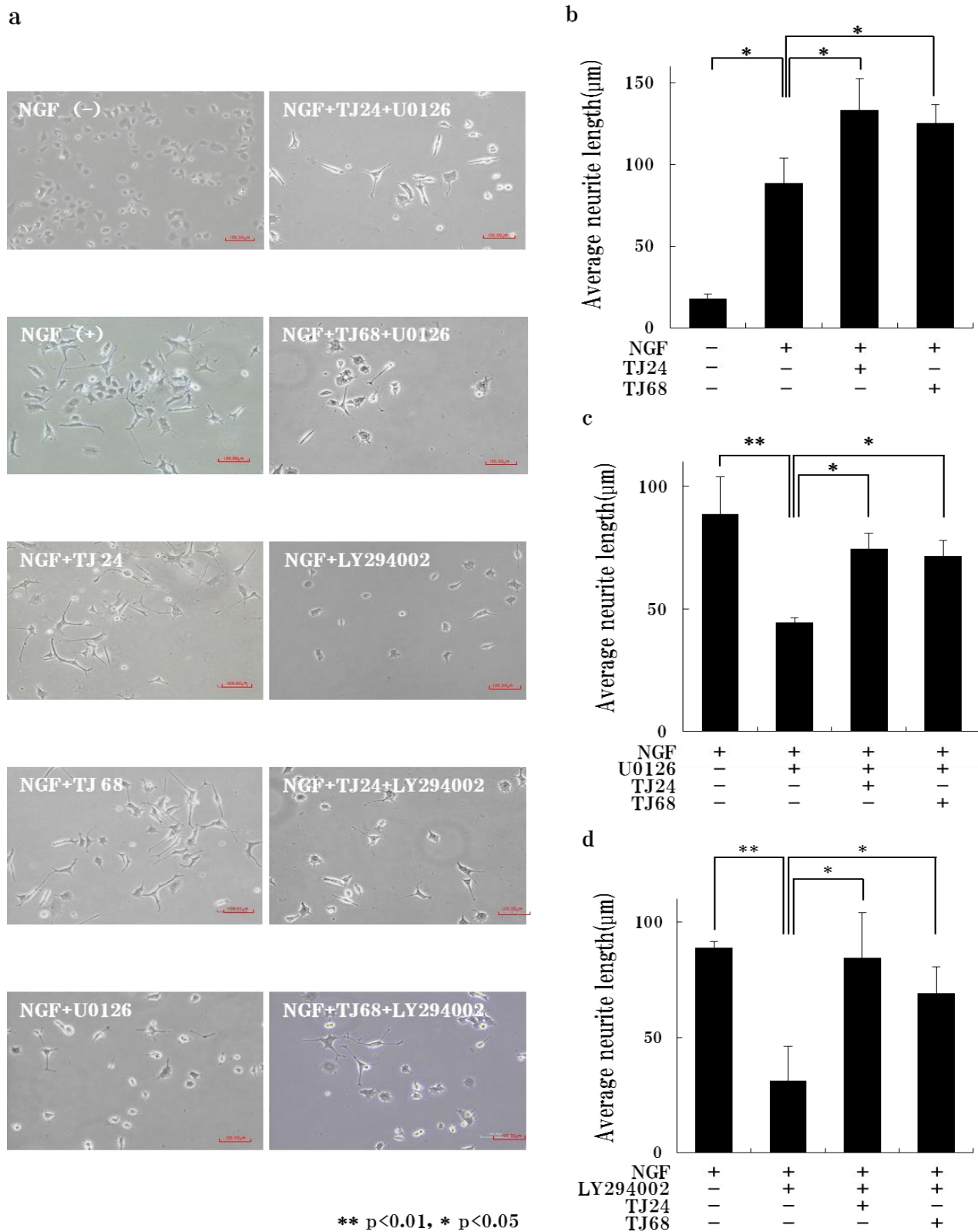


Figure2-6 漢方薬の神経突起伸長促進に対する特異的阻害剤を用いた比較

a：各漢方薬および特異的阻害剤がPC12細胞の形態に与える影響

b：各漢方薬がPC12細胞の神経突起伸長に与える影響

c：各漢方薬およびU0126がPC12細胞の神経突起伸長に与える影響

d：各漢方薬およびLY294002がPC12細胞の神経突起伸長に与える影響

2-13 漢方薬の Akt および Erk に対する影響

これまでの解析から、TJ24 および TJ68 は Erk および Akt のリン酸化促進を介して神経突起伸長を促進する可能性が示唆された。そこで、Erk 経路および Akt 経路における TJ24 と TJ68 の詳細な影響を明らかにするため、TJ24 または TJ68 を加えた際の Erk および Akt のリン酸化状態の変化をウェスタンブロットにて解析した。その結果、NGF と TJ24 または TJ68 を同時に添加した群において、NGF 単独群に比べて有意に Erk および Akt のリン酸化が促進されることが明らかとなった (Figure2-7)。

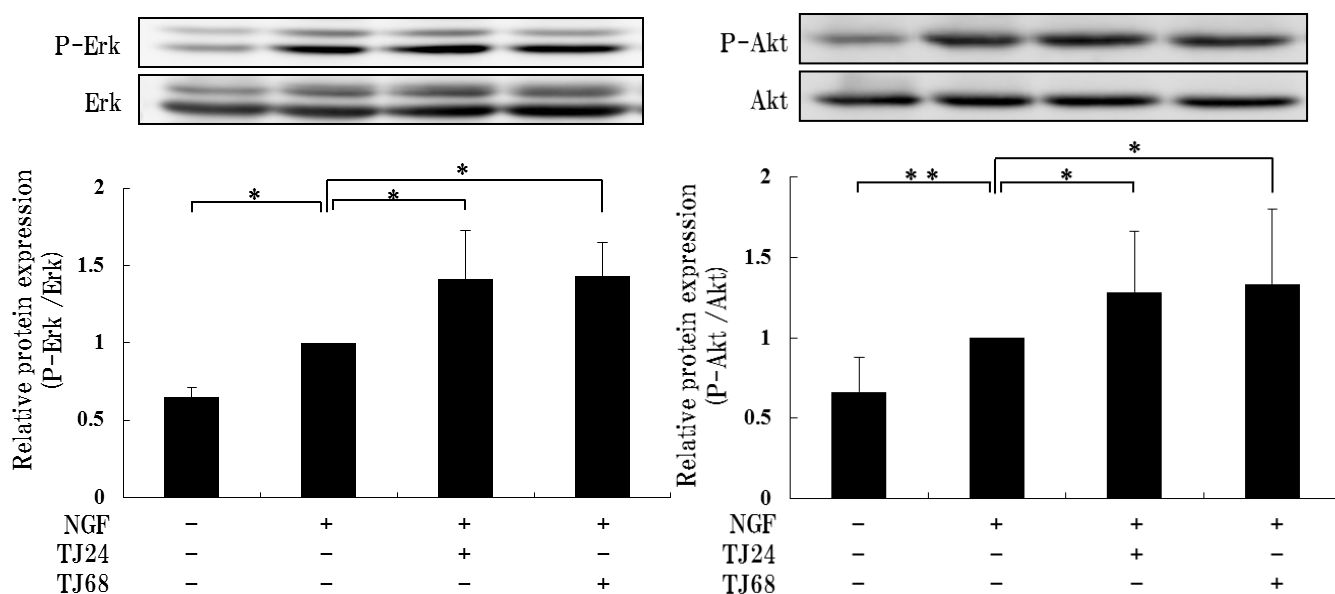


Figure2-7 漢方薬の Erk および Akt のリン酸化に対する影響

2-14 ヒト肺がん細胞における PTX の抗腫瘍効果に対する漢方薬の影響

PTX の抗腫瘍効果に対する TJ24 および TJ68 が与える影響についてヒト肺がん細胞から樹立した A549 細胞を用いて MTT assay を用いて確認した。 1.5×10^4 cell s /cm² にて A549 細胞を播種し3日間培養後、100 μ M PTX および TJ24, TJ68 同時に添加し、24時間処置した[34]。その結果、TJ24 および TJ68 は PTX と併用しても抗腫瘍効果は減弱しないことが明らかとなった (Figure2-8)。

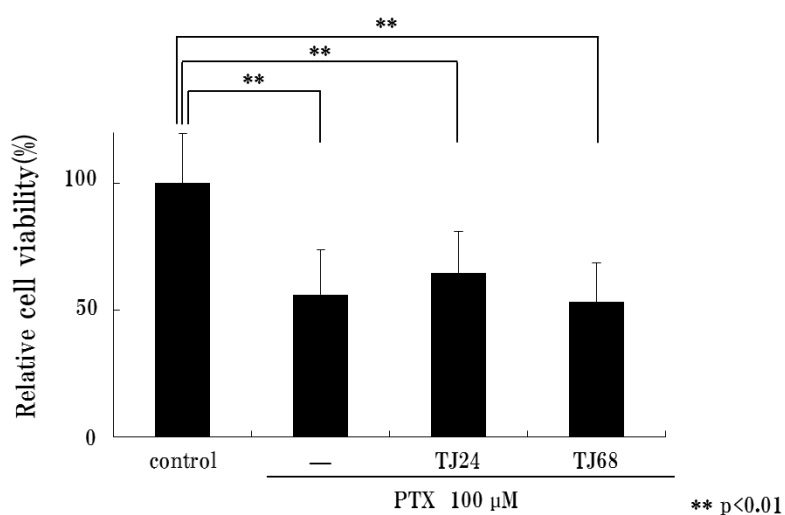


Figure2-8 ヒト肺がん細胞における PTX の抗腫瘍効果に対する漢方薬の影響

第3節 考察

PTX による副作用である CIPN は投与回数を重ねることに発現, 重篤化しやすいことが判明しているにも関わらず, CIPN に対する有効な改善薬は未だ見出されていない。臨床では, CIPN による神経障害性疼痛に対してプレガバリンやメチルコバラミンなどの対症療法を行っているが, どれも有効とは言い難い。また, カルシウムの流入を低下させ, 各種興奮性神経伝達物質の放出を抑制することにより鎮痛作用を発揮するプレガバリンなど一部の薬剤は腎機能障害などの副作用を持ちあわせており, 併用によりがん化学療法の継続自体を難しくする可能性を持つ。近年, PTX や L-OHP による末梢神経障害に対する TJ68 や TJ107 の有効性が報告されたが, その機序についての検討は行われておらず, 適応追加に至るまでのエビデンスとはならなかった[3, 27]。これらのことから著者は PTX 誘発性 CIPN により QOL が低下させられている現実を打破するため, PC12 細胞において PTX により引き起こされた神経突起退縮が TJ24 や TJ68, TJ107 により回復するという仮説を立て, その効果や機序についての検証を行った。

まず, PTX により有意な細胞障害を起こさず, 神経突起のみを退縮させた CIPN に近い状態の PTX 誘発神経障害モデルの作製し, 以後の実験での PTX 誘発性 CIPN はこのモデルを用いた (Figure2-3, 4)。次に神経突起退縮後の神経突起再生に関して, TJ24 と TJ68 を NGF に併用することで神経突起の回復に有意な差があることを明らかにした。しかし, TJ107 に関しては神経突起の長さ, GAP-43 および NF-L タンパク質の発現量, AchE 発現量のどれに関しても NGF 単独処置と比較し, 有意な差はなかった (Figure2-5)。TJ107 は L-OHP 誘発

性神経障害に有効な可能性が示唆されている点と今回の結果より、これらの違いは、神経障害の発生過程の違いが関与している可能性が考えられる。さらに著者は NGF 存在下にて神経突起伸長促進している点や Kubota らの抑肝散が Erk 経路および Akt 経路のリン酸化を介して PC12 細胞の神経突起を伸長させたという報告から、神経様細胞への分化段階において NGF による神経突起伸長に関わるシグナル伝達経路に着目し、2 つの漢方薬が与える影響について検証を行った[35]。神経様細胞への分化段階において TJ24 および TJ68 の有意な神経突起伸長が確認され、この神経突起伸長促進作用が抗がん剤による神経突起退縮からの回復に寄与した可能性が示唆された (Figure 2-6 a,b)。PC12 細胞の神経突起伸長課程における主なシグナル経路は Erk 経路と Akt 経路であるため、U0126 および LY294002 を用いて各漢方薬の関与する経路を検証し、どちらの経路にも関与する可能性を見出した (Figure 2-6 c, d)。[36]。TJ24, TJ68 のより詳細な機序の確認のため、著者は 2 つの経路の Erk および Akt のリン酸化比率を比較し、TJ24, TJ68 は Erk および Akt のリン酸化を促進することを確認した (Figure2-8)。漢方薬の有効成分についての更なる検討は TJ24, TJ68 および抑肝散の報告から、これらに共通して含有されており TJ107 に含有されない甘草に着目する必要性が示された。また、今回用いた TJ24 や TJ68 を PTX 治療継続中に併用する場合、PTX の抗腫瘍効果に対して効果減弱などの相互作用の確認が必要である。そこで、著者はヒト肺がん由来の A549 細胞を用いて PTX の抗腫瘍効果は各漢方薬併用下でも減弱することなく、安全かつ効果的に使用できることを明らかにした (Figure2-8) [37]。TJ24 および TJ68 は神

経細胞においてErk経路とAkt経路におけるリン酸化促進を介した神経突起伸長促進作用を有し、その作用はPTXのがん細胞への抗腫瘍効果を減弱することなく、PTX誘発性CIPNにも応用できる可能性が示唆された (Figure2-9)。その一方で、TJ107はPTX誘発性CIPNには有効ではないことが明らかとなり、抗がん剤の作用機序と組み合わせる漢方薬の作用機序を考慮する重要性とその機序解明の必要性が示された。

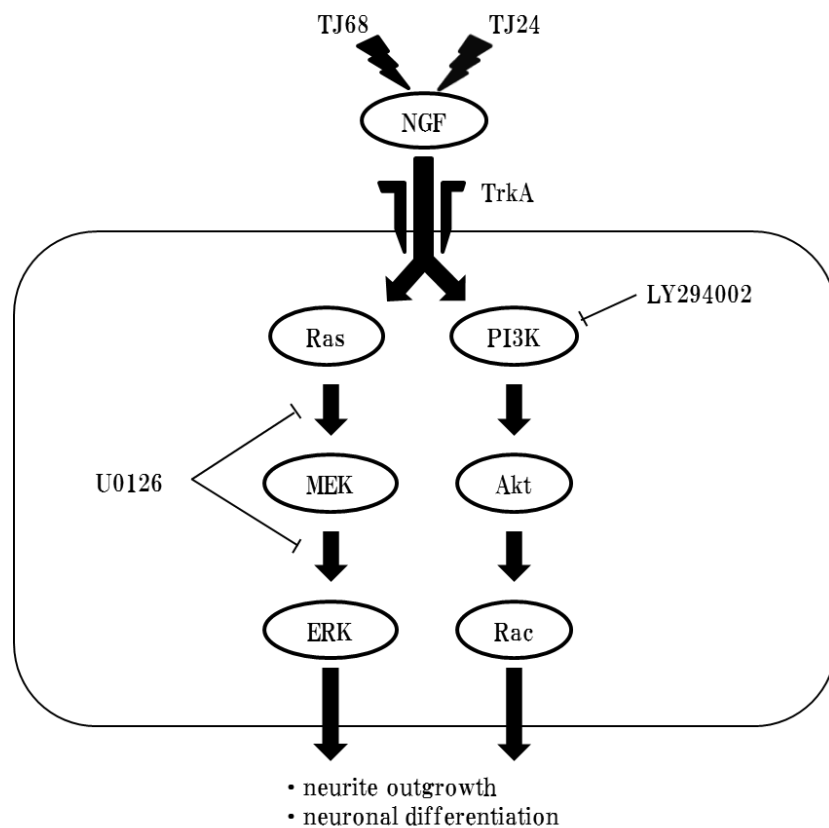


Figure2-9 PC12 細胞における TJ24, TJ68 の神経突起伸長促進作用

総括

本研究で用いた葛根湯，加味逍遙散，芍薬甘草湯，牛車腎気丸はそれぞれ，感冒，月経不順，こむら返り，しびれなどに臨床で頻繁に処方される漢方薬である．しかし，これらを含めた漢方薬の多くは予防薬や急性期治療薬として使用される反面，経験的あるいは伝統的に用いられることが多く，これらを裏付ける科学的エビデンスは少ない．近年，医学や薬学の進歩によって漢方薬に関するエビデンスも集積されつつあるが，東洋医学における陰陽五行説や五臓六腑の考え方は必ずしも今日の解剖学的知見と一致しておらず，作用機序や有効成分の解明，更なるエビデンスの蓄積が求められる．

本研究において VNR による細胞傷害に対するマオウ抽出物の eNOS のリン酸化の維持を介した血管内皮細胞の保護作用や，加味逍遙散および芍薬甘草湯が Erk や Akt のリン酸化を促進することで PC12 細胞の神経突起伸長促進作用およびそれが PTX 誘発性の CIPN の回復に応用できる可能性が示唆された．これらの結果は生薬抽出物や漢方薬のより詳細な作用機序解明や有効成分の特定につながるだけでなく，生薬や漢方薬は eNOS や Akt, Erk のリン酸化の促進など生体内で起こる反応に変化を与えることで効果発現につながることを示唆された．それは同時に，生体内での既存の反応に関与する可能性が高く，抗悪性腫瘍剤など他剤の薬効への影響が最小限に抑えられ，生薬や漢方薬の効果を発揮する可能性があると考えられる．

以上のことより，これからの生薬および漢方薬に関する研究において細胞応答や体内生理反応への上乗せ効果に着目する重要性だけでなく，生薬および漢方薬が抗がん剤の副作

用に対する支持療法になり得る可能性を見出した。本研究の結果は今後の生薬および漢方薬の研究において有用であると考ええる。

参考文献

1. Kurokawa M, Tsurita M, Brown J, Fukuda Y, Shiraki K: Effect of interleukin-12 level augmented by Kakkon-to, a herbal medicine, on the early stage of influenza infection in mice. *Antiviral Res* 2002, 56(2):183-188.
2. Ghasemi M, Azarnia M, Jamali M, *et al*: Protective effects of Ephedra pachyclada extract on mouse models of carbon tetrachloride- induced chronic and acute liver failure. *Tissue Cell* 2014, 46(1):78-85.
3. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, *et al*: The Kampo medicine, Goshajinkigan, prevents neuropathy in patients treated by FOLFOX regimen. *Int J Clin Oncol* 2011, 16(4):322-327.
4. Furuya M, Miyaoka T, Tsumori T, *et al*: Yokukansan promotes hippocampal neurogenesis associated with the suppression of activated microglia in Gunn rat. *J Neuroinflammation* 2013, 10:145.
5. Bonadonna G, Valagussa P, Moliterni A, Zambetti M, Brambilla C: Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in node-positive breast cancer: the results of 20 years of follow-up. *N Engl J Med* 1995, 332(14):901-906.
6. Rittenberg CN, Gralla RJ, Rehmeyer TA: Assessing and managing venous irritation associated with vinorelbine tartrate (Navelbine). *Oncol Nurs Forum* 1995, 22(4):707-710.
7. Tsai KL, Chiu TH, Tsai MH, Chen HY, Ou HC: Vinorelbine-induced oxidative injury in human endothelial cells mediated by AMPK/PKC/NADPH/NF- κ B pathways. *Cell Biochem Biophys* 2012, 62(3):467-479.
8. Yamada T, Egashira N, Imuta M, *et al*: Role of oxidative stress in vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radic Biol Med* 2010, 48(1):120-127.
9. Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, *et al*: Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1995, 55(22):5276-5282.
10. Malik S, Khalique H, Buch S, Seth P: A growth factor attenuates HIV-1 Tat and morphine induced damage to human neurons: implication in HIV/AIDS-drug abuse cases. *PLoS One* 2011, 6(3):e18116.
11. DeCoster MA, Lambeau G, Lazdunski M, Bazan NG: Secreted phospholipase A2 potentiates glutamate-induced calcium increase and cell death in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res* 2002, 67(5):634-645.
12. Bers DM: A simple method for the accurate determination of free [Ca] in Ca-EGTA

- solutions. *Am J Physiol* 1982, 242(5):C404-408.
13. Duchen MR: Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000, 529 Pt 1:57-68.
 14. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ: Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 2001, 276(32):30392-30398.
 15. Ruijters EJ, Weseler AR, Kicken C, Haenen GR, Bast A: The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. *Eur J Pharmacol* 2013, 715(1-3):147-153.
 16. Martindale JL, Holbrook NJ: Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002, 192(1):1-15.
 17. Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R: Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol* 2012, 2012:645460.
 18. Ladurner A, Atanasov AG, Heiss EH, *et al*: 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5-(E)-propenylbenzofuran promotes endothelial nitric oxide synthase activity in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 2012, 84(6):804-812.
 19. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, *et al*: The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 1999, 9(15):845-848.
 20. Devika NT, Jaffar Ali BM: Analysing calcium dependent and independent regulation of eNOS in endothelium triggered by extracellular signalling events. *Mol Biosyst* 2013, 9(11):2653-2664.
 21. Mount PF, Kemp BE, Power DA: Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* 2007, 42(2):271-279.
 22. Li H, Förstermann U: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000, 190(3):244-254.
 23. Chen LG, Liu YC, Hsieh CW, Liao BC, Wung BS: Tannin 1-alpha-O-galloylpunicalagin induces the calcium-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in endothelial cells. *Mol Nutr Food Res* 2008, 52(10):1162-1171.
 24. Wasserheit C, Frazein A, Oratz R, *et al*: Phase II trial of paclitaxel and cisplatin in women with advanced breast cancer: an active regimen with limiting neurotoxicity. *J Clin Oncol* 1996, 14(7):1993-1999.
 25. Postma TJ, Vermorken JB, Liefting AJ, Pinedo HM, Heimans JJ: Paclitaxel-induced neuropathy. *Ann Oncol* 1995, 6(5):489-494.

26. Lee JJ, Swain SM: Peripheral neuropathy induced by microtubule-stabilizing agents. *J Clin Oncol* 2006, 24(10):1633-1642.
27. Hidaka T, Shima T, Nagira K, *et al*: Herbal medicine Shakuyaku-kanzo-to reduces paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in mice. *Eur J Pain* 2009, 13(1):22-27.
28. Severin ES, Kondratyev AD: Regulation of differentiation of PC12 cells by nerve growth factor. *Adv Enzyme Regul* 1988, 27:357-370.
29. Takeshita M, Banno Y, Nakamura M, *et al*: The pivotal role of intracellular calcium in oxaliplatin-induced inhibition of neurite outgrowth but not cell death in differentiated PC12 cells. *Chem Res Toxicol* 2011, 24(11):1845-1852.
30. Kovarik Z, Radić Z, Berman HA, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Taylor P: Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem J* 2003, 373(Pt 1):33-40.
31. Scuteri A, Nicolini G, Miloso M, *et al*: Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer Res* 2006, 26(2A):1065-1070.
32. Kawashiri T, Egashira N, Itoh Y, *et al*: Neurotrophin reverses paclitaxel-induced neuropathy without affecting anti-tumour efficacy. *Eur J Cancer* 2009, 45(1):154-163.
33. Kudo TA, Kanetaka H, Shimizu Y, *et al*: Induction of neuritogenesis in PC12 cells by a pulsed electromagnetic field via MEK-ERK1/2 signaling. *Cell Struct Funct* 2013, 38(1):15-20.
34. Yamori T, Sato S, Chikazawa H, Kadota T: Anti-tumor efficacy of paclitaxel against human lung cancer xenografts. *Jpn J Cancer Res* 1997, 88(12):1205-1210.
35. Kubota K, Sano K, Shiraishi A, *et al*: Yokukansan, a traditional Japanese herbal medicine, promotes neurite out growth in PC12 cells through the activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Trad Med* 2013, 30(3):102-113.
36. Terada K, Kojima Y, Watanabe T, Izumo N, Chiba K, Karube Y: Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth from PC12 cells by dexamethasone: signaling pathways through the glucocorticoid receptor and phosphorylated Akt and ERK1/2. *PLoS One* 2014, 9(3):e93223.
37. Chen SZ, Jiang M, Zhen YS: HERG K⁺ channel expression-related chemosensitivity in cancer cells and its modulation by erythromycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005, 56(2):212-220.

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇切なる御指導，ご鞭撻を賜りました徳島大学大学院
医歯薬学研究部医科学部門内科系臨床薬剤学分野 石澤啓介教授，徳島大学薬学部臨床薬学
実務教育学 川添和義教授，岡田直人助教に厚く御礼申し上げます。また，細胞内カルシ
ウム濃度測定などにご協力くださいました徳島大学先端医療研究資源技術支援センター
庄野正行先生に心より感謝いたします。さらに，本研究に協力していただいた徳島大学薬
学部臨床薬剤学分野 須江和由氏，森山耕太氏，花房剛志氏に厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究に際し，終始温かく見守りご協力いただきました徳島大学病院薬剤部の
皆様ならびに徳島大学大学院医歯薬学研究部医科学部門内科系臨床薬剤学分野の皆様我心
から感謝いたします。